HIV-1 p24 ELISA キットの概要

HIV-1 p24 ELISA キットは、酵素結合免疫測定法(ELISA)を用いて、検体中の HIV-１p24 抗原を定量するものです。この方法は HIV 検査の第 4 世代 ELISA にも組み込まれています。このキットは、HIV-1 p24 抗原を定量するための研究用キットとして使用します。HRP を標識した検出抗体を使うため、検体の種類によりますが、ビオチン標識抗体を用いる他社の ELISA キットと比べ、反応は１回で済みます。また、このキットは、HIV-1 p24 に相当する HIV-2 の p26 にも交差反応することから、感度は低いながらその定量ができる場合があります。

HIV-1 p24 ELISA キットは「サンドイッチ」酵素免疫測定キットであり、抗 HIV-1 (p24)抗体でコートされたポリスチレン・マイクロウェルを使用しています。最初のステップとして、p24 抗原スタンダードと界面活性剤処理した検体をウェルに注入します。チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含まない検体の測定では、ペルオキシダーゼ(HRP)標識された捕獲用の抗 HIV-1p24 抗体を加え１時間インキュベーションします。一方、チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含む検体の測定では、予め抗原や検体のみを加えて１時間インキュベーションし、洗浄後に、ペルオキシダーゼ(HRP)標識された捕獲用の抗 HIV-1p24 抗体を加え１時間インキュベーションします。検体に p24 抗原が存在する場合、ウェルの中に捕獲され、同時に HRP 標識 p24 抗体でサンドイッチされます。未結合の HRP 標識抗体を除去するためマイクロウェルを洗浄し、その後、酵素基質発色液をウェルに加えます。Ab-p24-Ab(HRP)のサンドイッチ免疫複合体を含むウェルでは、無色から青色の溶液に変化します。硫酸を加えて反応を停止すると、溶液の色が青色から黄色になります。色の濃さは検体中の抗原の量と相関します。HIV-1 p24 が陰性の検体を入れたウェルは無色のままです。

▶ 全般的な注意

1. 本品は研究用試薬ですので、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 添付文書に記載の使用方法に従ってください。
3. 使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用してください。

▶ キット構成内容

No.	試 薬	性 状	規 格	主 要 成 分
1	固相ﾏｲｸﾛﾌﾟﾚｰﾄ	ﾌﾟﾚｰﾄ	96 ｳｪﾙ	抗 HIV-1 p24 ﾏｳｽﾓﾉｸﾛｰﾅﾙ抗体
2	HIV-1 p24 標準原液（2000pg/ml）	液 状	1mlx1	ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ HIV-1 p24 抗原
3	HRP 標識抗体（×100）	液 状	0.1mlx1	HRP 標識抗 HIV-1 p24 抗体
4	抗原抗体希釈液	液 状	100mlx1	ﾘﾝ酸緩衝液
5	洗浄液（×20）	液 状	50mlx1	ﾘﾝ酸緩衝液
6	発色液	液 状	8mlx2	クエン酸緩衝液
7	反応停止液	液 状	8mlx1	2N 硫酸

付属品：粘着フィルム　3 枚

▶ キット構成品以外に必要な材料・器具

1. 精製水
2. マイクロピペット（25～1000µl）
3. メスシリンダー（25～1000ml）
4. マイクロプレートウォッシャー
5. マイクロプレートリーダー（単 1 波長：450nm または 2 波長：主波長 450nm、参照波長 650nm）
6. ペーパータオル
7. 使い捨て手袋
8. 廃液処理液／廃液処理容器

▶ 操作上の注意

測定検体について

検体は、細胞培養上清、細胞可溶化物、血清や血漿です。

１)チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含む検体を測定する場合は、２ステップ方法で反応を行ってください。
（測定方法２参照）

２)血清や血漿検体は微生物に汚染されないように注意してください。

３）乳糜血漿や、黄疸、溶血したサンプルなどは誤った検査結果が出る可能性がありますので、使用しないでください。

４）検体は非働化しても測定できます。

５）検体は 2－8℃で保管してください。3 日以上検査する必要がない検体は凍結保存（－20℃以下）してください。

６）試薬やサンプルを繰り返し凍結・解凍をする事はさ

けてください。

▶ 洗浄の注意

1. 高いレベルの洗浄能力を保った高品質な ELISA 用マイクロプレート洗浄機を推奨します。一般的に偽陽性反応と高いバックグラウンドを防ぐため、350－400μl/ウェルの5回以上の自動洗浄サイクルを推奨します。
2. 手動洗浄する場合 5 サイクル、350－400μl/ウェルを注入し溶液の吸引という操作を 5 回繰り返す事を薦めます。結果が思わしくない場合（高いバックグラウンド）には、各ウェルの洗浄サイクルか漬込み時間を増やしてください。

▶ 安全性と注意事項

1. 試薬は別ロットのキットと混ぜないでください。本キットの試薬は検査時、最適な検査結果がでるように厳密に調整されています。
2. 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
3. 使用前、試薬とサンプルは室温（18－30℃）に戻してください。
4. 洗浄後、マイクロプレートを乾燥させないよう注意してください.
5. 人から採取した検体は全てに感染性のある可能性がありますので注意してください。
6. 測定に使用したチップやチューブ、廃液などは適切な処理をしてから廃棄してください。
7. 反応停止液をこぼした場合はただちに拭き、肌や目に触れた場合は水で洗浄してください。
8. HRP 標識化合物の酵素活性は、塵、反応薬剤や次亜塩素酸ナトリウム、酸、アルカリ等の影響を受ける可能性がありますので、これらの影響が無い場所で測定を行ってください。
9. 成分安全データ資料は問い合わせにより提供します。

▶準備

準備その１：洗浄バッファーを 1：20 の割合で蒸留水又は脱イオン水で調製します。

準備その２：必要な数のストリップをストリップ・ホルダーにセットしてください。使わないストリップは、元のバックに返して下さい。

準備その３：HRP 標識抗 HIV-1 p24 抗体の調製

HRP 標識抗体は使用する分量を別のチューブに測り、測定方法 1 または 2 に従った希釈濃度に抗原抗体希釈液で希釈してください。

▶ 測定方法１：チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含まない検体を測定するとき

(1) HIV-1 p24 標準溶液を抗原抗体希釈溶液で段階希釈し、各ウェルに 50μl ずつ加えます。測定サンプルも 50μl ずつ各ウェルに加えます。ブランクには抗原抗体希釈溶液を 50μl 加えます。

(2) 抗原抗体希釈液で 100 倍希釈に調製した HRP 標識抗体を 50μl ずつ各ウェルに添加します。

(3) プレートシールで覆い、室温で 60 分間、反応させます。

(4) 各ウェルを **5 回**、希釈洗浄バッファーで洗浄します。（手動洗浄する場合、毎回 30－60 秒程マイクロウエルを浸しておきます。最終洗浄サイクルの後、吸収性の高いティッシュの上にプレートを逆さにし、軽くたたいて残りの液体を取り除きます。）

(5) 発色液をあらかじめ室温に戻した後、ブランクを含めた各ウェルに 100μl の発色液を添加し、プレートシールでプレートを覆い、軽くプレートをたたき攪拌させてください。遮光し、室温で 15 分間インキュベートします。

(6)各ウェルに反応停止液を 50μl ずつ加え、軽く攪拌させてください。

(7) プレートリーダーで吸収度を測定します。

・測定波長 450nm

・参照波長 650nm

（**注**：反応停止後は、15 分以内に吸光度を測定してください。）

▶ 測定方法２：チッ化ソーダや EDTA またはクエン酸を含む検体を測定するとき

(1) HIV-1 p24 標準溶液を抗原抗体希釈溶液で段階希釈し、各ウェルに 100μl ずつ加えます。測定サンプルも 100μl ずつ各ウェルに加えます。ブランクには抗原抗体希釈溶液を 100μl 加えます。

(2) プレートシールで覆い、室温で 60 分間、反応させます。

(3) 各ウェルを 5 回、希釈洗浄バッファーで洗浄します。（手動洗浄する場合、毎回 30－60 秒程マイクロウエルを浸しておきます。最終洗浄サイクルの後、吸収性の高いティッシュの上にプレートを逆さにし、軽くたたいて残りの液体を取り除きます。）

(4) 抗原抗体希釈液で 200 倍希釈に調製した HRP 標識抗体を 100μl ずつ各ウェルに添加します。

(5) プレートシールで覆い、室温で 60 分間、反応させます。

(6) 各ウェルを 5 回、希釈洗浄バッファーで洗浄します。（手動洗浄する場合、毎回 30－60 秒程マイクロウェルを浸しておきます。最終洗浄サイクルの後、吸収性の高い

ティッシュの上にプレートを逆さにし、軽くたたいて残りの液体を取り除きます。）

(7) 発色液をあらかじめ室温に戻した後、ブランクを含めた各ウェルに 100µl の発色液を添加し、プレートシールでプレートを覆い、軽くプレートをたたき攪拌させてください。遮光し、室温で 15 分間インキュベートします。

(8)各ウェルに反応停止液を 50μl ずつ加え、軽く攪拌させてください。

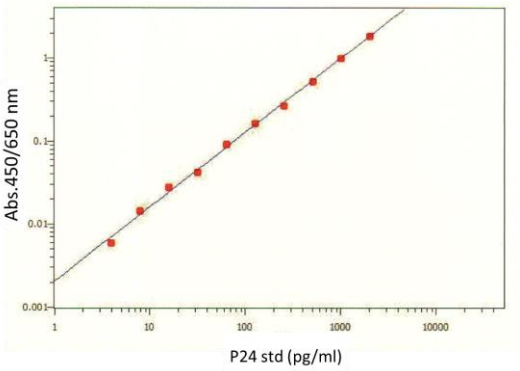
(9) プレートリーダーで吸収度を測定します。

・測定波長 450nm

・参照波長 650nm

（**注**：反応停止後は、15 分以内に吸光度を測定してください。）

▶ 検量線



▶ 保存と安定性

キットは凍結せずに 2－8℃で保管してください。

▶ 使用上の注意

本キットは研究用です。診断等には使用できません。

▶ 技術サポート

株式会社琉球免疫研究所

TEL: 098-923-2701, FAX: 098-923-2702

E-mail: info@rimco.jp